

DOI: 10.13376/j.cbls/2018040

文章编号: 1004-0374(2018)03-0319-08

外泌体分离与鉴定方法的研究进展

龚春梅, 徐远飞, 周继昌*

(深圳市慢性病防治中心, 深圳 518020)

摘要: 外泌体是一种由细胞分泌的膜性囊泡小体, 存在于多种体液、分泌物和排泄物中, 形成一种特殊的细胞间信息传递系统或病理表征, 其携带的 mRNA、miRNA 和蛋白质等生物分子可作为疾病诊断的新型标志物。建立稳定而成熟的外泌体分离与鉴定方法是进行外泌体及其生物学意义研究的前提。目前的外泌体分离技术包括离心、沉淀、超滤、免疫亲和及微流控等技术。鉴定技术主要基于电子显微形态学、颗粒大小及浓度的纳米示踪、蛋白质免疫印迹、流式细胞术等。现对这些技术进展进行综述, 这将有助于研究者结合自身条件选择合适的方法获取外泌体, 以开展相关研究。

关键词: 外泌体; 分离; 鉴定

中图分类号: O658; Q74 文献标志码: A

Research progress on isolation and identification of exosomes

GONG Chun-Mei, XU Yuan-Fei, ZHOU Ji-Chang*

(Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518020, China)

Abstract: Exosomes are membranous vesicles secreted by cells, which exist in a variety of body fluids, secretions and excretions to form a special intercellular signal transduction system or a pathological phenomenon. Biomolecules (mRNAs, miRNAs, proteins, etc.) contained in exosomes can be used as new markers for disease diagnosis. The establishment of stable and mature methods for the isolation and identification of exosomes is a prerequisite for the study of exosomes and their biomedical significance. The current methods of exosomes isolation include centrifugation, precipitation, ultrafiltration, immunoaffinity, and microfluidic technology. Identification techniques are mainly based on electron microscopic morphology, particle size of the nano-tracer, protein immunoblotting, flow cytometry, and so on. This review on these technological advances will help researchers to select the appropriate method to obtain exosomes under their available experimental conditions for relevant studies.

Key words: exosome; isolation; identification

1987年, Johnstone 等^[1]在研究网织红细胞的发育时, 从其培养上清液中分离纯化了一种囊泡状物质, 并命名为外泌体(exosomes), 它来自于多泡体(multivesicular body, MVB), 是多泡体限制性膜与细胞质膜融合而释放的脂质双层膜囊泡, 直径约30~100 nm, 电子显微镜下外泌体呈独特的杯状结构。在被发现后的相当长的一段时间里, 外泌体仅仅被当做是细胞向外排出废物的载体。但随着外泌体内容物逐渐被人们了解, 尤其是功能性蛋白、mRNA 及微小 RNA (microRNA, miRNA) 的发现, 使得外泌体成了最近的研究热点。本文将简要综述

近年来在外泌体的分离纯化及鉴定技术方面取得的研究进展。

1 外泌体的形成与组成

1.1 外泌体的形成

外泌体可以通过细胞外刺激、微生物攻击和其

收稿日期: 2017-06-22; 修回日期: 2017-09-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(81172669, 81372993, 81202239)

*通信作者: E-mail: Flintzhou@163.com; Tel: 0755-25503842

他应激条件的诱导等而生成^[2]。在刺激作用下,细胞内溶酶体微粒内陷形成 MVB, 其与细胞膜融合, 向胞外分泌大小均一的囊泡, 即是外泌体, 但其形成与分泌的具体分子机制还需进一步的探讨。目前普遍的观点认为, 异于普通微泡直接由细胞出芽脱落生成, 外泌体的形成始于细胞内陷形成早期内体 (early endosome), 随后在内体转运复合体 (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 及一些相关蛋白的调控下, 早期内体内出芽形成多个腔内小囊泡构成的 MVB, 后者最后在 GTP 酶家族中的 RAB 酶的调节下与细胞膜融合向外界分泌腔内囊泡, 即外泌体^[3-4]。

1.2 外泌体的组成

外泌体是一类纳米级的膜性囊泡, 含 mRNAs、miRNAs、蛋白质及脂类物质等, 并且膜上也有信号分子 (CD63、CD9 等)^[5]。其中的核酸能够通过外泌体与靶细胞膜的融合被受体细胞吸收, 控制受体细胞的蛋白表达或激活信号通路^[6]。截至目前, 外泌体中已发现有 9 769 种蛋白质、3 408 种 RNA、2 838 种 miRNA 及 1 116 种脂类物质。外泌体在肿瘤微环境中含量尤其丰富, 与肿瘤的发生发展、免疫逃逸、微环境建立密切联系^[7]。1996 年, Raposo 等^[8]在研究 EB 病毒转染的人 B 细胞时发现, 一些有膜结构的小囊泡表面表达的主要组织相容性复合体 II 类分子 (major histocompatibility complex II, MHC-II) 能激活 T 细胞并在体内起到抗原递呈作用。这些小囊泡的形成过程和排出途径与红细胞外泌体相似。目前普遍认为的外泌体所共有的蛋白包括热休克蛋白^[9]、四跨膜蛋白家族、多囊泡胞内体产生相关蛋白 (ALIX、TSG101 等)^[10]、GTP 酶 RAB 家族等, 这些成分多与外泌体的形成与起源有关。此外, 2007 年, Valadi 等^[6]在鼠和人的肥大细胞中首次证明了外泌体中 mRNA 和 miRNA 等 RNA 的存在, 并发现 mRNA 可在靶细胞中翻译成蛋白质, 且随后的一大批外泌体研究发现了更多种类的 miRNA。还有文献报道在微泡中检测到反转录转座子 RNA 转录物、单链 DNA、线粒体 DNA 和癌基因扩增子 (cmyc)^[11-13]。不仅如此, Thakur 等^[14]在研究白血病、结肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌等多种来源的癌细胞外泌体时, 还发现其中含有稳定的双链 DNA, 提示其可能成为潜在的癌症诊断的生物标志物。

2 外泌体的功能

近年来, 越来越多的研究表明, 外泌体在肿瘤

诊断^[15]、迁移生长^[16-17]、组织损伤修复^[16]、免疫抗原呈递^[17]及神经退行性疾病^[18]中起着极其重要的作用。Belov 等^[19]将已知的肿瘤表面标志物固定于芯片上, 通过抗体芯片分别检测细胞与血浆中外泌体标志物, 约 40% 的癌细胞表面标志物在囊泡表面体现, 说明抗体芯片检测外泌体表面蛋白有望应用于肿瘤诊断。有研究发现, 细胞表面蛋白多糖磷脂酰肌醇聚糖 -1 (GPC1) 在胰腺癌个体血液外泌体中含量丰富, GPC1 阳性的循环外泌体 (GPC1⁺ crExos) 在该项研究中能以 100% 的准确率和敏感性诊断出早期与晚期胰腺癌; 而在临床应用前, 建立稳定的外泌体分离方法和大规模样本的验证还有待进行^[20]。随着对外泌体所含功能性蛋白、mRNA 及 miRNA 等成分的研究, 外泌体在体内信号转导中的作用也逐渐被认识, 它们在心血管疾病^[21]、神经系统疾病^[22]及肿瘤^[15]的诊断、治疗等中都扮演着极其重要的角色。同时, 外泌体作为疾病治疗药物运送载体的研究也在不断发展^[22]。

3 外泌体分离与鉴定

外泌体广泛存在于体液 (血清、脑脊液等)、分泌物 (唾液、乳汁、精液等) 及排泄物 (尿液等) 中^[23]。从各种样品中分离并鉴定外泌体, 对于后期的实验研究是至关重要的。

3.1 外泌体的分离

3.1.1 差速超速离心法

差速超速离心法是最常用的外泌体纯化手段, 采用低速离心、高速离心交替进行, 可分离到大小相近的囊泡颗粒。Johnstone 等^[1]最初发展了差速离心法用于网织红细胞组织培养液中外泌体的分离; They 等^[3]对该方法进行了优化, 改进后的方法见图 1。以 300 g、2 000 g 和 10 000 g 离心, 分别去除细胞、死细胞和细胞碎片; 利用超高速离心 (>100 000 g) 得到外泌体的粗提取物, 重复操作 2 次, 以去除污染蛋白质, 从而得到外泌体。该方法被广泛应用于各类生物样品, 如血清、血浆^[24]、细胞培养液^[25]、尿液^[26]、唾液^[27]和脑脊液^[28]等的分析, 是目前应用最为广泛的外泌体分离方法, 也是目前的“金标准”。该法虽然操作简单, 获得的囊泡数量较多, 但过程比较费时, 且回收率不稳定 (可能与转子类型有关), 纯度也受到质疑; 此外, 重复离心操作还有可能对囊泡造成损害, 从而降低其质量。

3.1.2 沉淀法

一般认为聚合物沉淀外泌体的机理是体积排阻

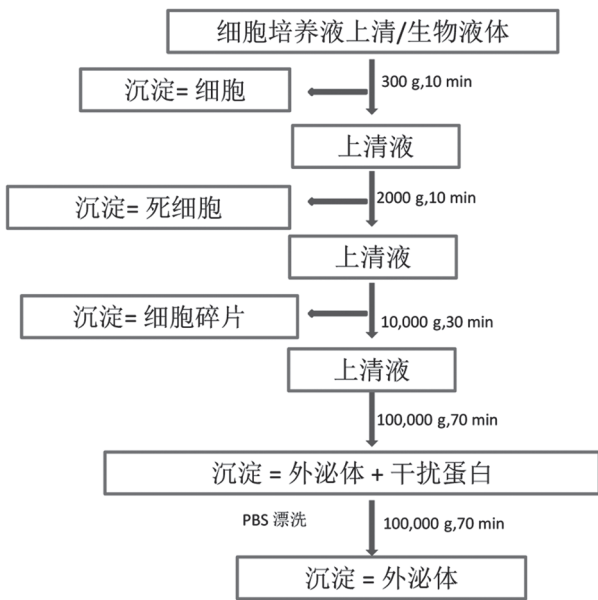


图1 差速离心法提取外泌体的步骤

的聚合物通过“劫持”水分子，从而造成外泌体溶解度的降低，进而在低速离心条件下发生沉降，不过该机理还值得进一步研究。许多公司先后开发了一系列针对不同样品来源(血清、血浆、细胞培养液、尿样等)的外泌体提取试剂盒，其核心试剂之一是聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)，实现外泌体的快速分离和纯化。如用于尿液外泌体分离的ExoQuick、Pure-Exo、Total Exosome Isolation等产品，但这些商品化的试剂盒价格昂贵。近年有国内外研究人员还描述了一种以PEG为基础的ExtraPEG技术，通过对大体积培养液低速离心沉淀后的小体积超速离心，快速而廉价地富集外泌体。分离的外泌体聚集体的大小和形态在高分辨率电子显微镜下清晰可见^[29-30]，并能用于后续的外泌体定量、蛋白和

RNA 定量、蛋白组学和测序等多种分析与研究，分离得到的囊泡生物活性也不受影响；同时，这种方法不仅能用于多种生物样本不同囊泡组分的富集，也可用作进一步纯化前的高效浓缩。这些都预示该技术用于生物标志物的开发和诊断的前景。但利用PEG沉淀外泌体还存在其他不少问题：纯度和回收率低、杂蛋白较多(假阳性)、颗粒大小不均一、产生难以去除的聚合物、机械力或者吐温-20等化学添加物部分破坏外泌体等。图2以ExoQuick公司试剂盒提取尿液外泌体为例，展示了沉淀法的大致过程^[31]。

3.1.3 超滤法

由于外泌体是一个大小约几十纳米的囊状小体，大于一般蛋白质，利用不同截留相对分子质量(MWCO)的超滤膜对样品进行选择分离，便可获得外泌体。Cheruvanky等^[32]利用超滤法成功从尿液中纯化分离出外泌体，该方法样品预处理过程简单且无需特殊设备。Lai等^[33]利用能截留不同相对分子质量(100×10^4 、 50×10^4 、 30×10^4 和 10×10^4)的滤膜成功分离出人间充质干细胞培养液中的外泌体，但该方法需要利用特殊的装置，限制了其应用。德国Bioo Scientific公司开发了基于超滤膜的商品化设备，可用于外泌体的分离和纯化(<http://www.biooscientific.com>)。该设备有2~3层滤膜，利用离心力分别截留细胞及直径较大的囊泡物质，以获得不同尺寸的囊泡。新西兰Izon Science公司推出了qEVTM凝胶渗透色谱柱，用于外泌体的分离和纯化(<http://www.izon.com>)。外泌体的粒径较蛋白质和脂类物质大，能够快速通过分离柱；而蛋白质和脂类物质与填料间的相互作用力较大，通过色谱柱的速度较慢，从而实现外泌体与杂质的高效分离，以得

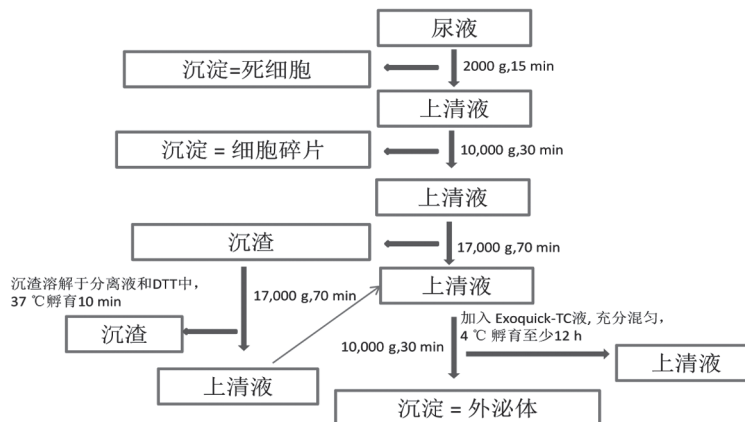


图2 以尿液为例，用沉淀法提取外泌体的步骤^[31]

到纯度较高的外泌体。该技术操作简单、使用方便、富集效率高。然而,该色谱柱对于上样量有严格的要求,一般在 0.5 mL 以内,否则会降低外泌体的分离效率。此外,由于蛋白质和脂类的严重污染,该色谱柱无法多次重复使用 (<3 次),限制了该产品的应用。超滤离心法简单高效,且不影响外泌体的生物活性,是提取细胞外泌体的一种新方法。

3.1.4 亲和层析法

外泌体表面带有许多特殊的膜蛋白质,如 CD9、CD63、ALIX、ANNEXIN、EpCAM 和 RAB5 等,可以用作分离外泌体的特异性标记^[34]。利用相应抗体与这些蛋白质间的特异性相互作用,将抗体固定于磁珠、色谱固定相等基质上,以实现对外泌体的特异性富集。抗体包被的磁性小珠有效地用于从抗原呈递细胞分离外泌体^[35],如 MBL 公司利用结合了针对外泌体表面抗原 (CD9、CD63、CD81 和 EpCAM) 抗体的磁性粒子,特异性捕获外泌体表面标志蛋白,从而达到分离外泌体的目的。还有商品试剂盒 (如日本 Wako 公司的 MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS) 采用磁珠和磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合蛋白的方法,很方便地从血清等样品中获得高纯度的外泌体和其他来自细胞培养基和体液的胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs),并利用中性 pH 的金属螯合试剂,将捕获的 EVs 从磁珠上洗脱下来,可以获得完整的外泌体和其他 EVs。此外,使用抗肿瘤相关的 HER2 和 EpCAM 抗体从肿瘤细胞培养液中分离出来源于肿瘤细胞的外泌体^[36]。然而,使用抗体包被的磁珠分离法不适合从大量样本获得外泌体,而基质的非特异性吸附会导致获得的外泌体中存在干扰蛋白质。同时,亲和富集法存在成本高、使用和保存条件苛刻等问题。

3.1.5 微流控技术

新兴的微流控芯片技术是另一种前景看好的方法。它是一种基于外泌体的物理和生物化学性质的微尺度分离,如免疫亲和力、大小和密度,除此之外还可以实现诸如声学^[37]、电泳^[38]和电磁^[39]操作之类的创新分选机制。通过使用这种装置,预期样品体积、试剂消耗和分离时间显著降低。如 IBM 公司的纳米级确定性侧向位移微柱芯片 (nanoscale deterministic lateral displacement pillar arrays, nano-DLD) 处理含有外泌体等微粒的液体样品时,较小颗粒在流体的方向上以 Z 字形运动,而较大颗粒沿微柱不对称的方向撞击阵列,不同尺寸的颗粒因而被分离用于检测或分析^[40]。最近,国家纳米科学中

心和中科院的研究者合作开发了一种基于黏弹性的微流体系统,以连续、大小依赖和无标记的方式从细胞培养基或血清中直接分离外泌体,使用少量的生物相容性聚合物作为介质中的添加剂来控制施加在 EV 上的黏弹性,能够获得高分离纯度 (> 90%) 和回收率 (> 80%) 的外泌体。该技术可以作为多功能平台,以便于在不同的生化应用中开展外泌体分析^[41]。然而,微流控技术缺乏标准化和大规模临床样本测试,也缺乏相关的方法验证而难以大规模应用。

3.1.6 其他

来自美国宾州大学、东南大学的研究人员研发出一种新颖的脂质纳米探针方法,可以快速、经济且高效地分离纳米级的胞外囊泡 (nEV),并能够从非小细胞肺癌患者分离的 nEV 中识别相关遗传突变。他们的分离方法采用生物素标记的聚乙二醇链和二酰基脂质尾作为标记探针,NeutrAvidin (生物素) 涂层的磁亚微米颗粒作为捕获探针。首先,通过将脂质尾部锚定到 nEV 膜中,使得标记探针与 nEV 结合,然后将 nEV 固定在磁性颗粒上,最后通过施加磁场来分离 nEV。分离程序仅需 15 min,并具有与长时间标准超离心方案相似的捕获效率。此外,通过脱硫生物素 (亲和力较生物素低) 与生物素置换的方法,研究者从前者标记的探针中收获的 nEV 保留了 nEV 的生物学功能^[42]。各种外泌体提取技术及其原理和优缺点详见表 1。

3.2 外泌体的鉴定

由于现存的分离技术是基于外泌体的大小、结构和一些膜蛋白的捕获,很难完全将其与其他囊泡和大分子蛋白质复合体区分开,这便需要对其进行鉴定^[50]。外泌体的鉴定主要依赖形态学特征、纳米颗粒示踪分析检测颗粒大小^[51]、蛋白质印迹技术和流式细胞技术分析外泌体标志性蛋白 (CD9、CD63、CD81、HSP90 等)^[52]。外泌体常见鉴定方法优缺点详见表 2。

3.2.1 电子显微镜检测形态

扫描电镜 (scanning electron microscopy, SEM) 或透射电镜 (transmission electron microscopy, TEM) 等电子显微镜可用于外泌体鉴定。SEM 的工作原理是用能量为 1~30 KV 间的电子束,以光栅状扫描方式照射到被分析试样的表面上,利用入射电子和试样表面物质相互作用所产生的二次电子和背散射电子成像,获得试样表面微观组织结构和形貌的高分辨率信息。由于超高真空技术的发展,场发射电子

表1 常用外泌体提取技术、原理和优缺点

技术	具体方法	优势	劣势	文献
离心法	超高速差速离心法、 密度梯度离心法	金标准、浓度高、纯化率高、样本量大	费时、费力、高度依赖人工、回收率不高, 外泌体形态大小不一, 高速离心会损害外泌体而影响下游分析	[2,29-30]
沉淀法	商品化试剂盒	使用方便, 不需要专业设备, 可扩展样品容量	杂蛋白污染多、颗粒形态差, 试剂昂贵	[43-44]
超滤法	微孔膜过滤、超滤、 排阻色谱	操作简单、快速, 回收率高, 设备成本低、便携性好, 可直接提取RNA	过膜易损耗变形, 堵塞的可能性大, 蛋白污染严重, 易附着膜而损失	[39,45,52-53]
免疫亲和法	免疫磁珠	特异性高、纯度高, 可获得高纯化的外泌体	未明确所有表面标记, 高试剂成本、低产量, 仅适用于无细胞样品, 肿瘤异质性阻碍免疫识别, 抗原表位可能被阻断或掩蔽	[35,45,47]
微流控技术	微流控芯片	快速、低成本、便携, 易于自动化并整合, 液体流动可控, 消耗试剂少、回收率好	缺乏标准化和大规模临床样本测试, 缺乏方法验证, 样品容量低	[37,39,48-49]

表2 外泌体常见鉴定方法优缺点

技术	具体方法	优势	劣势
电子显微镜检测	扫描电镜(SEM) 或透射电镜 (TEM)	能直接观察结构和形态, 鉴别不同大小的外泌体; SEM可得到表面微观形貌; TEM可观察材料内部结构和形貌	样品的预处理和制备复杂、要求较高, 不适于大量快速测量; 无法准确测量预处理后的外泌体浓度; 固定会使外泌体结构收缩; 所需设备昂贵
粒径及浓度检测	动态光散射、外 泌体颗粒示踪 分析(NTA)	动态光散射测量下限为10 nm, 对单分散性粒子敏感度较高; NTA可直接、实时观测纳米颗粒, 对单分散性和多分散性粒子均较准确	动态光散射技术是测量光强的波动数据, 大颗粒的光强波动信号会掩盖较小颗粒的光强波动信号, 不适合大小不一的复杂外泌体样本的测量; NTA的测量下限仅为70 nm
Western blot法	表面标志物检测	方法成熟	根据外泌体不同类型的细胞来源, 检测的标志物可能有所不同
流式细胞术	检测粒径及表面 标志物	快速、高通量, 可分析颗粒的大小与体积, 所需样本的浓度较低	测量下限为400 nm(新式数码流式细胞仪可达100 nm), 不能分辨更小的外泌体; 且以光信号监测为技术基础, 准确性和分辨率欠佳

枪的应用得到普及, 现代先进的 SEM 的分辨率已经达到 1 nm 左右, 足够用来进行外泌体尺寸的测量。TEM 是把经加速和聚集的电子束投射到非常薄的样品上, 电子与样品中的原子碰撞而改变方向, 从而产生立体角散射。散射角的大小与样品的密度、厚度相关, 因此可以形成明暗不同的影像, 影像放大、聚焦后在成像器件(如荧光屏、胶片、感光耦合组件)上显示出来。目前 TEM 的分辨力可达 0.2 nm^[53]。

鉴于电镜的以上性能特征, 它能直接观察到样品中外泌体的形态和粒径, 对其实现鉴别。操作步

骤大致是: 用 PBS 重悬提取的外泌体, 滴于孔径 2 nm 的载样铜网上, 室温静置 2 min, 用滤纸从滤网侧边吸干液体, 用 3% 磷钨酸溶液在室温下负染 5 min, 滤纸吸干负染液, 室温晾干, 电镜观察拍照。外泌体在电镜下具有非常明显的膜边界、呈 30~100 nm 大小不一的茶托或杯状结构(也会有 200 nm 以下、较难鉴别的其他形状的外泌体), 但电镜对样品的预处理和制备要求较高, 样品分离方法和样品性质可能影响电镜结果的好坏; 样品的准备阶段比较复杂, 不适合对外泌体进行大量快速的测量; 且因外泌体经过了预处理和制备过程, 无法准确测量

其浓度。

3.2.2 纳米颗粒示踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)检测外泌体粒径及浓度

在外泌体研究领域, NTA 技术已被用作外泌体表征手段之一; 相较于其他表征方式, NTA 技术的样本处理更简单, 更能保证外泌体原始状态, 检测速度更快。大致方法是: 将收集的外泌体用 PBS 稀释至 $10^6/\text{mL}$, 用 1 mL 注射器注入纳米颗粒跟踪分析仪(如装有 450 nm 激光器的 Nanosight NS300 颗粒粒度分析仪); 激光光束穿过样本室外泌体颗粒, 通过装有摄像头的显微镜实现颗粒可视化, 捕捉外泌体的布朗运动, 利用爱因斯坦方程式根据其运动计算浓度和流体动力学直径^[54]。SBI 公司新开发的一种排除非外泌体颗粒干扰的试剂盒, 还可帮助实现对完整外泌体的 NTA 分析。

3.2.3 Western blot测定外泌体表面特异性分子标志物

参照标准的 Western blot 检测步骤, 利用外泌体表面抗原递呈蛋白(如 CD63、CD8、TSG101、Flotillin-1、ALIX、CD9、CD81 和 CD82 等)的优质单克隆抗体提高鉴定结果的可靠性, 如有研究者用 ALIX、CD63 和 CD9 单克隆抗体对肝癌细胞的外分泌体进行了成功鉴定^[55]。

3.2.4 流式细胞仪检测外泌体的生物标志物

流式细胞仪检测技术比较快速, 适合高通量筛选, 且可分析颗粒的大小与体积。用外泌体表面特异性标志物相应的抗体进行标记, 用流式细胞仪检测其阳性表达, 从而验证外泌体。如染色后的外泌体溶液加入分支聚乙烯亚胺(PEI), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 15 min, 之后超速离心去除 PEI, 然后加入金纳米颗粒, 轻柔重悬后置于培养箱中 60 min, 加入别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC) DNA 染料, 室温孵育 15 min 后流式细胞仪检测。APC 阳性的颗粒即为所需检测的外泌体^[56]。

4 展望

考虑到外泌体的异质性和性能的细微差异, 许多激动人心的外泌体分离新技术(包括微流体、nanointerfaces、电渗析、免疫亲和捕捉后洗脱等)仍在探索中。此外, 今天认为是“金标准”的方法可能需要进一步优化, 如基于密度梯度浮选动力学的超速离心法无法分离更多不同物理性质、不同表面标记和不同生物起源(Rab-dependent 相比 Rab-independent)的外泌体。超速离心法的速度/离心力、温度、时间等条件优化还可影响外泌体的性能。总

之, 作为研究外泌体生物学特征和医学应用的重要基础, 外泌体的分离技术和后续鉴定方法仍有待不断完善。

[参 考 文 献]

- [1] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 1987, 262: 9412-20
- [2] De Toro J, Herschlik L, Waldner C, et al. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol*, 2015, 6: 203
- [3] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 569-79
- [4] Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16: 415-21
- [5] Aryani A, Denecke B. Exosomes as a nanodelivery system: a key to the future of neuromedicine? *Mol Neurobiol*, 2016, 53: 818-34
- [6] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 654-9
- [7] Yu S, Cao H, Shen B, et al. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. *Oncotarget*, 2015, 6: 37151-68
- [8] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 1996, 183: 1161-72
- [9] Xiao W, Dong W, Zhang C, et al. Effects of the epigenetic drug MS-275 on the release and function of exosome-related immune molecules in hepatocellular carcinoma cells. *Eur J Med Res*, 2013, 18: 61
- [10] Helwa I, Cai J, Drewry MD, et al. A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PLoS One*, 2017, 12: e0170628
- [11] Balaj L, Lessard R, Dai L, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun*, 2011, 2: 180
- [12] Guescini M, Genedani S, Stocchi V, et al. Astrocytes and glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)*, 2010, 117: 1-4
- [13] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 1470-6
- [14] Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*, 2014, 24: 766-9
- [15] Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 2015, 523: 177-82

- [16] Khan M, Nickoloff E, Abramova T, et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ Res*, 2015, 117: 52-64
- [17] Rao Q, Zuo B, Lu Z, et al. Tumor-derived exosomes elicit tumor suppression in murine hepatocellular carcinoma models and humans *in vitro*. *Hepatology*, 2016, 64: 456-72
- [18] Thompson AG, Gray E, Heman-Ackah SM, et al. Extracellular vesicles in neurodegenerative disease - pathogenesis to biomarkers. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12: 346-57
- [19] Belov L, Matic KJ, Hallal S, et al. Extensive surface protein profiles of extracellular vesicles from cancer cells may provide diagnostic signatures from blood samples. *J Extracell Vesicles*, 2016, 5: 25355
- [20] Herreros-Villanueva M, Bujanda L. Glypican-1 in exosomes as biomarker for early detection of pancreatic cancer. *Ann Transl Med*, 2016, 4: 64
- [21] Ong SG, Lee WH, Huang M, et al. Cross talk of combined gene and cell therapy in ischemic heart disease: role of exosomal microRNA transfer. *Circulation*, 2014, 130: S60-9
- [22] Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release*, 2015, 207: 18-30
- [23] Ibrahim A, Marban E. Exosomes: fundamental biology and roles in cardiovascular physiology. *Annu Rev Physiol*, 2016, 78: 67-83
- [24] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 27031
- [25] Jeppesen DK, Nawrocki A, Jensen SG, et al. Quantitative proteomics of fractionated membrane and lumen exosome proteins from isogenic metastatic and nonmetastatic bladder cancer cells reveal differential expression of EMT factors. *Proteomics*, 2014, 14: 699-712
- [26] Franzen CA, Blackwell RH, Foreman KE, et al. Urinary exosomes: the potential for biomarker utility, intercellular signaling and therapeutics in urological malignancy. *J Urol*, 2016, 195: 1331-9
- [27] Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, et al. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One*, 2010, 5: e8577
- [28] Chiasserini D, van Weering JR, Piersma SR, et al. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: a comprehensive dataset. *J Proteomics*, 2014, 106: 191-204
- [29] Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DJ. ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Sci Rep*, 2016, 6: 23978
- [30] Weng Y, Sui Z, Shan Y, et al. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst*, 2016, 141: 4640-6
- [31] Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi RR, et al. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int*, 2012, 82: 1024-32
- [32] Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292: F1657-61
- [33] Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*, 2010, 4: 214-22
- [34] Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*, 2009, 9: 4997-5000
- [35] Clayton A, Court J, Navabi H, et al. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immunomagnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 2001, 247: 163-74
- [36] Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, et al. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res*, 2005, 25: 3703-7
- [37] Lee K, Shao H, Weissleder R, et al. Acoustic purification of extracellular microvesicles. *ACS Nano*, 2015, 9: 2321-7
- [38] Davies RT, Kim J, Jang SC, et al. Microfluidic filtration system to isolate extracellular vesicles from blood. *Lab Chip*, 2012, 12: 5202-10
- [39] Wang Z, Wu HJ, Fine D, et al. Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles. *Lab Chip*, 2013, 13: 2879-82
- [40] Wunsch BH, Smith JT, Gifford SM, et al. Nanoscale lateral displacement arrays for the separation of exosomes and colloids down to 20 nm. *Nat Nanotechnol*, 2016, 11: 936-40
- [41] Liu C, Guo J, Tian F, et al. Field-free isolation of exosomes from extracellular vesicles by microfluidic viscoelastic flows. *ACS Nano*, 2017, 11: 6968-76
- [42] Wan Y, Cheng G, Liu X, et al. Rapid magnetic isolation of extracellular vesicles via lipid-based nanoprobe. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 0058
- [43] Gallo A, Alevizos I. Isolation of circulating microRNA in saliva. *Methods Mol Biol*, 2013, 1024: 183-90
- [44] Oksvold MP, Kullmann A, Forfang L, et al. Expression of B-cell surface antigens in subpopulations of exosomes released from B-cell lymphoma cells. *Clin Ther*, 2014, 36: 847-62.e1
- [45] Zarovni N, Corrado A, Guazzi P, et al. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods*, 2015, 87: 46-58
- [46] Zeringer E, Barta T, Li M, et al. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc*, 2015, 2015: 319-23
- [47] Akagi T, Kato K, Kobayashi M, et al. On-chip immunoelectrophoresis of extracellular vesicles released from human breast cancer cells. *PLoS One*, 2015, 10: e0123603
- [48] Vaidyanathan R, Naghibosadat M, Rauf S, et al. Detecting exosomes specifically: a multiplexed device based on alternating current electrohydrodynamic induced

- nanoshearing. *Anal Chem*, 2014, 86: 11125-32
- [49] Chen C, Skog J, Hsu CH, et al. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip*, 2010, 10: 505-11
- [50] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 2013, 200: 373-83
- [51] Salomon C, Yee S, Scholz-Romero K, et al. Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 175
- [52] Lasser C, Eldh M, Lotvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*, 2012: e3037
- [53] Wu Y, Deng W, Klinke DN. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst*, 2015, 140: 6631-42
- [54] 黄依瑶, 唐月汀, 覃思华, 等. 血清中外泌体及外泌体 RNA 提取方法的比较. *中华检验医学杂志*, 2016, 39: 427-32
- [55] 陈加贵, 邓敬桓, 何敏. 肝癌细胞外泌体的分离与鉴定. *世界华人消化杂志*, 2016, 24: 737-43
- [56] 肖漓, 白剑, 陈文, 等. 脐带间充质干细胞外泌体的分离和鉴定. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2016, 8: 236-9